

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Die Bedeutung kombinierter Färbeverfahren nach immuno-elektrophoretischer Analyse pathologischer Seren

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Hannelore Margarethe Knopff
aus Königsberg/Pr.



Referent: Prof. Dr. med. N. Henning

Dekan: Prof. Dr. med. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: *21* 7. November 1961

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. N. HENNING)

Die Bedeutung kombinierter Färbeverfahren nach immunoelektrophoretischer Analyse pathologischer Seren

Von F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ UND H. KNOPFF

Die mit neueren Geltechniken, insbesondere mit der Immuno-elektrophorese nach GRABAR UND WILLIAMS gegebenen Möglichkeiten einer weiteren Differenzierung von Proteingemischen haben sich auch für klinische Fragestellungen bewährt. Hierfür sprechen die umfangreichen Ergebnisse, die in den letzten fünf Jahren in der einschlägigen Literatur mitgeteilt wurden. Die weitaus meisten Resultate liegen dabei über die rein immunologische Differenzierung pathologischer Seren vor; danach ist es möglich, auf Grund der Anzahl von Präzipitationslinien, ihrer elektrophoretischen Mobilität, wie auch ihrer Position zueinander, im Vergleich zu einem Normalserum, Abweichungen verschiedener Einzelkomponenten des menschlichen Serums aufzuzeigen. Darüber hinaus gelingt es, durch kombinierte Färbe- oder auch fermentative Verfahren die einzelnen Eiweißkörper näher zu charakterisieren. Diese Tatsache ist auch für die Analyse abartiger sowie pathologisch vermehrter oder verminderter Serumfraktionen von Bedeutung. Unseres Wissens wurden allerdings diese Möglichkeiten in Verbindung mit der Gelelektrophorese, abgesehen von den Grundlagenarbeiten der GRABARSCHEN Schule (8, 9, 10, 11, 12) selbst, für praktische Belange nicht genügend angewandt. Uns erschien jedoch gerade im Hinblick auf differentialdiagnostische Fragestellungen eine Analyse pathologischer Seren nach qualitativen Gesichtspunkten gerechtfertigt. Dabei interessierte zunächst die Abgrenzbarkeit der Coeruloplasminfraktion von Kohlenhydratkomponenten im α_2 -Bereich, weiterhin aber auch die Differenzierbarkeit anderer Serum-Glyko-

proteide von Proteinen, die sonst nur mit Amidoschwarz darstellbar sind.

Versuchsanordnung und Methodik

Aus einem unausgewählten Krankengut wurden insgesamt 44 Seren mit der Elektrophorese im Agargel analysiert, wobei jeweils die einfache Gelelektrophorese sowie die Immunelektrophorese angesetzt wurden. Außerdem kamen 10 Normalseren zur Untersuchung. Nach Abschluß der Elektrophorese bzw. nach völliger Auspräzipitierung sämtlicher Serumkomponenten gegen ein Antihumanserum wurden Kupfer-, Kohlenhydrat- und Proteinfärbungen vorgenommen. Diese Färbungen ließen sich bei jeder Serumanalyse im Agargel kombiniert durchführen, das heißt es wurde zunächst die Kupferfraktion dargestellt, danach die Kohlenhydrat- und schließlich die Proteinfärbung angewandt. Die einzelnen Resultate wurden sodann, unter Berücksichtigung der klinischen Diagnose, in Gruppen zusammengefaßt (Tab. I).

Elektrophorese im Agargel

Methodische Einzelheiten über die einfache Gelelektrophorese sowie über die Immunelektrophorese sind dem einschlägigen Schrifttum zu entnehmen (2, 3, 4, 10, 13).

Färbungen

1) Coeruloplasmindarstellung (Fermentmethode) (8a):

Reagenzien: Na-Acetat · 3 H₂O, Eisessig, 50%iger Alkohol (Äthylalkohol), p-Phenylendiamin, Natriumazid.

Lösung I: Na-Acetat-Puffer pH 5,7, Ionenstärke $\mu = 0,1$.

Lösung II: Na-Acetat-Puffer pH 4,7, Ionenstärke $\mu = 0,1$.

Lösung III: Reagens, welches unmittelbar vor Gebrauch frisch bereitet werden muß: 21,6 mg p-Phenylendiamin in 100 ml der Lösung I auflösen, 10 ml einer bestimmten Natriumazidlösung (0,650 g Natriumazid auf 1 l Aqua dest.) hinzugeben und auf 37° C erhitzen.

Lösung IV: Lösung zum leichten Abziehen der fertigen Elektrophoresestreifen von der Glasplatte. 10 ml Eisessig, 150 ml Glycerin, ad 1000 ml Aqua dest., gut mischen.

Arbeitsgang: Die Platten mit einfacher Agarelektrophorese werden unmittelbar, die Platten mit Immunelektrophorese nach dreitägigem Wässern (mit mehrmaligem Wechseln) in physiologischer Kochsalzlösung folgendem Arbeitsgang unterworfen: Elektrophoreseplatten 2 Std. lang bei 37° C in Lösung III legen. Danach zweimal nacheinander je 2 Std. lang in Lösung I waschen. Anschließend bei 37° C trocknen. Danach 1 Std. lang in Lösung IV belassen und wieder bei 37° C trocknen.

2) Kohlenhydratfärbung (9, 12):

Reagenzien:

Lösung I: 50 ml einer 10%igen Na-Metabisulfit-Lösung, 50 ml einer 2 n HCl, ad 1000 ml Aqua dest.

Lösung II: Lösung I zu 20% mit Glycerin versetzen (200 ml Glycerin ad 1000 ml Aqua dest.).

Lösung III: 10%iges Hydroxylaminchlorhydrat, in Na-Acetat-Puffer pH 4,7, Ionenstärke $\mu = 0,1$ herstellen.

Lösung IV: 1%ige Perjodsäure, in Schwefelsäure n/10.

Lösung V: SCHIFFSches Reagens, vor Gebrauch jeweils 1:1 verdünnt mit Aqua dest. verdünnt, frisch herstellen.

Arbeitsgang: Die Elektrophoreseplatten werden folgendermaßen vorbehandelt: Bei einfacher Gelelektrophorese 6 bis 12 Std. lang in 2%iger Essigsäure präzipitieren, an-

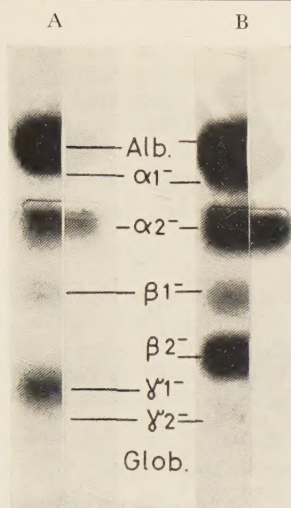


Abb. 1

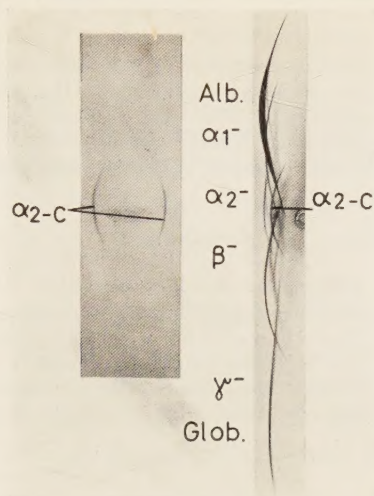


Abb. 2a

Abb. 1. Einfache Gelelektrophorese zweier verschiedener Seren (A, B), wobei jeweils links die Proteinfärbung, rechts die Coeruloplasminfärbung (C) durch Fermentreaktion dargestellt sind. Serum A: Makroglobulinämie (rel. schwache Färbung der Coeruloplasminfraktion). Serum B: Ungeklärte β_2 -Globulinvermehrung ohne Kriterien für β -Myelom! (rel. starke Anfärbbarkeit der Coeruloplasminfraktion).

Abb. 2a. Coeruloplasmin Darstellung nach Immuno-elektrophorese. Man erkennt eine feine gefärbte Präzipitationslinie, die, verglichen mit der Proteinfärbung derselben Serumanalyse, einer α_2 -Globulinfraktion entspricht. α_2 -c = Coeruloplasmin.

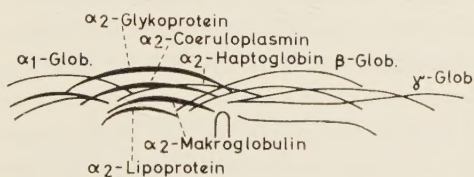


Abb. 2b. Halbschematische Darstellung der Präzipitationslinien des α_2 -Globulinbereiches nach Immuno-elektrophorese eines Normalserums.



Abb. 3. Gedoppelte Präzipitationslinie nach Fermentreaktion zur Darstellung des Serum-Coeruloplasmins. Es handelt sich um das Serum eines Patienten mit Dermatomyositis.

schließlich bei 37° C trocknen. Nach Immunelektrophorese 3 Tage lang in physiologischer Kochsalzlösung wässern, danach ebenfalls trocknen. Die Platten werden nun 15 Min. lang in Lösung III gelegt; 15 Min. lang unter fließendem Wasser gewaschen; 10 Min. lang in Lösung IV gelegt; 10 Min. lang unter fließendem Wasser gewaschen; 3 Min. lang in Lösung V, 3mal 2 Min. in Lösung I, schließlich 3mal 1 Std. in Lösung II belassen. Abschließend im Brutschrank bei 37° C trocknen.

3) Proteinfärbung (8b, 10):

Färbung mit Amidoschwarz 10 B. Vorbehandlung der Elektrophoreseplatten wie für Kohlenhydratfärbung. 1g Amidoschwarz wird in 1000 ml eines Gemisches von Na-Acetat-Puffer pH 3,7 und Glycerin (850 ml Puffer + 150 ml Glycerin) gelöst. Die Elektrophoreseplatten werden 6 (mindestens 3) Std. lang in der Färbelösung belassen. Danach successives Entfärben in 2%iger Essigsäure, versetzt zu 15% mit Glycerin. Trocknen der Platten bei 37° C.

Ergebnisse

Coeruloplasmindarstellung: Bei einfacher Elektrophorese im Agar-gel ließ sich in allen untersuchten Fällen mit der Fermentreaktion ausschließlich eine Fraktion darstellen, die, verglichen mit der Proteinfärbung des jeweils gleichen Serums, dem α_2 -Globulinbereich entspricht (Abb. 1).

Bei immunoelektrophoretischer Analyse und anschließender Fermentreaktion ließ sich in der Regel eine einzige Präzipitationslinie im α_2 -Bereich als *Coeruloplasmin* gefärbt nachweisen (Abb. 2a). Hinsichtlich ihrer Position zu benachbarten Proteinsystemen des α_2 -Bereiches liegt die kupferbindende Fraktion zwischen dem typischen α_2 -Makroglobulin und dem Lipoprotein einerseits und dem etwas weitbogig verlaufenden α_2 -Glykoprotein andererseits (Abb. 2b). In einzelnen untersuchten pathologischen Seren wurden – regelmäßig reproduzierbar – zwei eng benachbarte Coeruloplasmin- bzw. fermentaktive Komponenten beobachtet (Abb. 3).

Unter den zunächst unausgewählten pathologischen Seren fiel eine beachtliche *Intensitätsschwankung* der Färbung auf. Dies kommt in besonderer Deutlichkeit bei einfacher Gelelektrophorese zur Darstellung.

Auf Grund der vorliegenden Beobachtungen läßt sich, unter Berücksichtigung der klinischen Diagnose folgendes aussagen: Bei Carcinomen, chronisch verlaufenden malignen Bluterkrankungen, bei Myelomen – hier kamen vorläufig 3 γ -Myelome zur Untersuchung –, beim Myocardinfarkt, aber auch bei verschiedenen

chronischen Entzündungsprozessen fand sich eine, gegenüber Normalseren *intensivere* Farbreaktion (vgl. Tab. I, I). Verglichen mit den Befunden der routinemäßigen Papierelektrophorese und anderer Laboratoriumsbefunde der entsprechenden Seren, bestand in allen diesen Fällen eine mehr oder weniger ausgeprägte Dysproteinämie mit vorwiegender Vermehrung der α -, insbesondere der α_2 -Globuline.

Bei einer anderen Gruppe von Patienten, vorwiegend mit Stoffwechselerkrankungen, fand sich eine praktisch *normale* Coeruloplasmin-Konzentration (vgl. auch Tab. I, II). In allen diesen Fällen wurden auch papierelektrophoretisch keine oder nur geringfügige Abweichungen der Relation der Serumeiweißkörper festgestellt.

In Fällen mit Leberzirrhose, in wenigstens zwei Fällen mit chronischem Leberparenchymschaden, bei einer rezidivierenden Hepatitis, ferner bei einer Agammaglobulinämie sowie bei einer Makroglobulinämie wurde eine erheblich *schwächere* Anfärbbarkeit der Coeruloplasminfraktion beobachtet (Tab. I, III). Papierelektrophoretisch war in den entsprechenden Seren wohl eine Dysproteinämie faßbar, jedoch bezogen sich die relativen Verschiebungen vorwiegend auf das Albumin (Verminderung) sowie auf die β - und γ -Globuline (Vermehrung dieser Fraktionen). Die α -Fraktionen waren in diesen Fällen quantitativ unverändert oder vermindert.

In Einzelfällen fanden sich bei einer Colitis ulcerosa eine ausnehmend schwache Färbung der α_2 -Kupferfraktion, bei einer Silikose hingegen eine besonders starke Anfärbbarkeit der Coeruloplasminfraktion und schließlich bei einem bislang noch ungeklärten Krankheitsbild, bei welchem neben einer stark beschleunigten Blutkörperchen-senkung lediglich eine deutliche β -Globulinvermehrung auffiel, ebenfalls eine besonders hohe Konzentration des fermentaktiven Coeruloplasmins.

Kohlenhydratfärbung: Bei der Kohlenhydratfärbung ließen sich in Normalseren praktisch alle Eiweißfraktionen darstellen. Bemerkenswert war vor allem das Ergebnis der immunoelektrophoretischen Analyse: auch hier ließen sich nahezu sämtliche Unterfraktionen, einschließlich der Coeruloplasminfraktion, anfärben, auch wenn die Färbung einzelner Präzipitationslinien relativ zart ausfiel.

Bei den untersuchten pathologischen Seren traten die größten Intensitätsschwankungen im Bereich der α_1 - und der α_2 -Globuline auf. Verglichen mit der vorgenannten Kupferdarstellung im α_2 -Bereich, konnte bis zu einem gewissen Grade festgestellt werden,

Tabelle

Die Tabelle wurde nach den Ergebnissen der Kupferfärbung zusammengestellt, wobei in Gruppe I alle die Fälle aufgeführt sind, die eine besonders deutliche, also stärker als normale, Kupferfärbung ergeben haben. In der neben den Befunden der Coeruloplasminfärbung angefügten Spalte sind die Resultate nach Kohlenhydratfärbung der entsprechenden Seren eingetragen.

GRUPPE I

Lfd. No.	Diagnose	Cu-Färbg.	KH-Färbg.
1	Magencarcinom	++	(+)
2	Magencarcinom mit Lebermetastasen	++	+
3	Pankreascarcinom	++	+
4	Pankreascarcinom mit Lebermetastasen	++	+
5	Mammacarcinom, metastasierend	++	(+)
6	Mammacarcinom, metastasierend	++	(+)
7	fragl. Lungenmetastasen nach Mammaamputation (chron. rezidiv. Pleuritis)	++	+
8	Lymphosarkom	++	+
9	Lymphosarkom	++	+
10	chron. myel. Leukämie	+	(+)
11	chron. myel. Leukämie	++	(+)
12	Dermatomyositis	++	+
13	prim. chron. Polyarthrit	++	+
14	chron. Bronchitis, Diabetes	++	+
15	chron. Bronchitis, Asthma bronchiale	++	(+)
16	Herzdekompensation mit Stauungsbronchitis	++	+
17	Herzinfarkt, Infarktpneumonie	++	+
18	rezidiv. Cholangitis	++	+
19	rezidiv. Cholangitis	++	(+)
20	Cholelithiasis mit chron. rezidiv. Cholangitis	++	+
21	Colitis ulcerosa	++	(+)
22	unklare β_2 -Globulin-Vermehrung	+++	+
23	unklare Paraproteinämie (γ_1 -Globulin)	++	+
24	unklare Paraproteinämie (β/γ -Globulin)	++	+
25	Silikose	+++	(+)

daß in Fällen mit Vermehrung vorwiegend der α_2 -Globuline diese einmal vorzugsweise durch eine Anreicherung der Coeruloplasminfraktion, zum anderen vorwiegend durch eine Vermehrung der kohlenhydratreichen α_2 -Proteine bedingt ist. So zeigte sich, daß zum Beispiel bei malignen Prozessen – zumindest in Spätstadien – sowie beim γ -Myelom die relative α_2 -Vermehrung durch eine Coeruloplasminanreicherung bedingt ist, daß hingegen bei akuten Entzündungen aller Art und auch bei chronisch rezidivierenden entzündlichen Prozessen mit akuten Schüben (Polyarthrit, Colitis

GRUPPE II

Lfd. No.	Diagnose	Cu-Färbg.	KH-Färbg.
26	Diabetes mellitus	+	+
27	Diabetes mellitus	+	+
28	Diabetes mellitus	+	(+)
29	Diabetes mellitus	+	(+)
30	Diabetes mellitus mit KIMMELSTIEL-WILSON-Syndrom	+	+
31	Epilepsie	+	+
32	Colica mucosa	+	++
33	Polycythämie (nicht Vollbild!)	+	+
34	akuter fieberhafter Infekt	+	++
35	hochfieberhafter Infekt	+	++
36	Pancarditis rheumatica	+	++

Die in dieser Gruppe II zusammengestellten Fälle weisen eine wie bei Normalen faßbare Coeruloplasminfärbung auf (die 10 untersuchten Seren von Gesunden sind tabellarisch nicht erfasst). In der Spalte der Befunde nach Kohlenhydratfärbung finden sich hier in Fällen mit akut entzündlichen Prozessen deutlich stärker ausgefallene Farbintensitäten; sie beziehen sich in der Hauptsache auf die stärkere Anfärbbarkeit von α_2 -Globulinen.

GRUPPE III

Lfd. No.	Diagnose	Cu-Färbg.	KH-Färbg.
37	Leberparenchymschaden	(+)	+
38	Leberzirrhose	(+)	+
39	Leberzirrhose	(+)	(+)
40	Leberzirrhose	(+)	(+)
41	rezidivierende Hepatitis mit Leberparenchymschaden	(+)	+
42	Colitis ulcerosa (I. Schub!)	(+)	++
43	Agammaglobulinämie	(+)	(+)
44	Makroglobulinämie	(+)	++

Die in Gruppe III aufgeführten Fälle zeigen durchweg eine schwächere Anfärbbarkeit der Coeruloplasminfraktion als bei Normalseren. Die Kohlenhydratfärbung ergibt unterschiedliche Befunde.

Zeichenerklärung: + = mit der Färbung bei einem Normalserum vergleichbare Farbintensität
 (+) = schwächer als normal
 ++ = stärker als normal
 +++ = außergewöhnlich starke Anfärbbarkeit

ulcerosa) vorwiegend die Glykoproteide die α_2 -Globulinvermehrung bedingen (vgl. auch Tab. Gruppe I, III).

Eine ausgesprochen *schwächere* Anfärbbarkeit einzelner Fraktionen war unter den analysierten pathologischen Seren nicht eindeutig faßbar. Atypische und gleichzeitig vermehrte Globuline ließen sich im allgemeinen auch mit der Kohlenhydratfärbung darstellen.

Proteinfärbung: Bei Vergleich der Proteinfärbung mit den Ergebnissen der vorgenannten Spezialfärbungen zeigte sich insofern eine gute Übereinstimmung, als in Fällen mit deutlich vermehrter Fermentaktivität im α_2 -Bereich auch eine stärkere Präzipitationslinie für das Coeruloplasmin auftrat. In Fällen mit Kohlenhydratvermehrung zeigte auch die Proteinfärbung vielfach eine Intensitätszunahme der entsprechenden Komponenten. So beweisen Einzelbeobachtungen, zum Beispiel bei akut entzündlichen Prozessen mit verstärkter Kohlenhydratfärbung etwa der zuäüßerst gelegenen, weitbogigen α_2 -Linie auch eine stärkere Proteinfärbung, woraus hervorgeht, daß auch zwischen diesen beiden Färbungen zumindest in quantitativer Hinsicht Beziehungen bestehen.

Auf die charakteristischen immunoelektrophoretischen Kriterien nach Proteinfärbung näher einzugehen, erübrigt sich an dieser Stelle. Über solche Phänomene, insbesondere in pathologischen Seren, wurde bereits berichtet (6).

Diskussion

Nach Schrifttumsangaben können zufolge der Untersuchungen mit radioaktivem Kupfer (5, 14) sowie mit einer spezifischen Kupferfärbung (8a, 11) zwei kupfertragende Komponenten im menschlichen Normalserum nachgewiesen werden: eine mit der Wanderungsgeschwindigkeit der Albuminfraktion, eine weitere, meist quantitativ stärkere, im Bereich der α_2 -Globuline. Bei der spezifischen Kupferfärbung lassen sich interessanterweise diese beiden Komponenten nur mit einfacher Elektrophorese im Agargel darstellen, während mit der Immunoelektrophorese lediglich die im α_2 -Bereich gelegene Komponente sichtbar gemacht werden kann.

Bei Anwendung der Enzymreaktion, bei welcher eine Oxydation des p-Phenylendiamin durch Coeruloplasmin erfolgt, wird sowohl mit der einfachen Agarelektrophorese als auch mit der Immunoelektrophorese ausschließlich *eine* Fraktion im α_2 -Bereich erfaßt. Aus diesen Gegebenheiten ist zu schließen, daß die im Albuminbereich wandernde Kupferfraktion keine enzymatische Aktivität besitzt und offenbar ein nur flüchtig kupfertragendes Protein darstellt. Dagegen entspricht die bereits charakterisierte α_2 -Globulinfraktion mit ausgesprochenen Fermenteigenschaften dem Coeruloplasmin. Ihr dürfte die weitaus größere Bedeutung für den Kupfertransport im Blute zukommen. Zur Darstellung des Coeruloplas-

mins wurde deshalb für die vorliegenden Untersuchungen nur die Methode der Oxydasereaktion gewählt. Die gute Reproduzierbarkeit der hiermit erzielten Ergebnisse ermöglicht unter anderem einen zuverlässigen Vergleich pathologischer Seren mit Normalseren. Es sei allerdings mit Nachdruck darauf hingewiesen, daß die frisch entnommenen Seren unverzüglich dem Untersuchungsgang unterworfen werden müssen, da die Fermentaktivität *in vitro* kontinuierlich abnimmt. Überalterte Seren haben – wie in eigenen Voruntersuchungen bewiesen werden konnte – ihre Oxydaseaktivität verloren.

Die bei Normalseren erhobenen Befunde stimmen mit den Angaben der einschlägigen Literatur (8a) gut überein. Nicht völlig geklärt sind Einzelcobachtungen bei pathologischen Seren, in welchen dicht neben der Coeruloplasminfraktion im α_2 -Bereich eine fast parallel verlaufende, deutlich schwächer anfärbbare Präzipitationslinie auftrat. Möglicherweise handelt es sich in diesen Fällen um Diffusionseffekte oder um Überschußphänomene, die als Kunstprodukte aufzufassen sind. Es muß aber auch daran gedacht werden, ob diese Doppelung nicht Ausdruck einer quantitativen Anreicherung oder aber einer pathologischen qualitativen Variante der Kupferfraktion sein kann.

Wie aus den Ergebnissen erkennbar wird, findet man bei Tumorerkrankungen, γ -Myelomen und bei ausgesprochen chronisch verlaufenden malignen sowie entzündlichen Prozessen, aber auch beim Myocardinfarkt eine Anreicherung der Coeruloplasminfraktion. Eine Vermehrung des Serumkupfers erklärt sich im wesentlichen durch *Freisetzung* von Kupfer bei Gewebszerfall mit nachfolgender Bindung des Schwermetalles an ein entsprechendes Serumprotein. Ein im Prinzip gleicher Vorgang dürfte in all den Fällen zutreffen, in welchen zwar kein Zellerfall im engeren Sinn des Wortes, sondern eine Zell-Läsion, etwa durch entzündliche oder degenerative Reaktionen, mit Permeabilitätsstörungen an der Zellmembran und mit Abräumvorgängen anzunehmen ist. Dieser Modus der Freisetzung von Kupfer und fermentaktiven Proteinen kommt vor allem in Spätstadien von Tumorerkrankungen mit Gewebszerfall in Betracht. Bekanntlich hat ja das Tumorgewebe einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Eisen und Kupfer. Auf die Coeruloplasminanreicherung bei Myelomen wurde bereits an anderer Stelle hingewiesen (2). Beim Myocardinfarkt dürfte die umschriebene Gewebsläsion als Ursache der Freisetzung verschiedener

fermentaktiver Proteine anzunehmen sein, da die hohen Fermentaktivitäten im Serum zur Zeit des akuten Geschehens nachgewiesen werden. Es wäre in den genannten Beispielen, insbesondere bei Tumorerkrankungen, von Interesse, vergleichende Untersuchungen über den Coeruloplasmingehalt von Organextrakten (aus Operationspräparaten) und entsprechenden Seren anzustellen.

Schließlich kann eine Anreicherung von Coeruloplasmin im Serum noch mit einem erhöhten Umsatz bzw. einer erhöhten Aktivierung von Kupfer, etwa durch übergeordnete nervale oder hormonale Steuerung erklärt werden. Hierfür spricht zum Beispiel die Tatsache, daß nach Angaben in der Literatur (5) bei Hyperthyreosen eine starke Vermehrung der Coeruloplasminfraktion gefunden wird.

Eine Verminderung der Coeruloplasminfraktion dürfte im wesentlichen auf eine Erschöpfung der proteinbildenden Zentren zurückzuführen sein. Dies trifft vor allem bei schweren Leberzirrhosen mit Hypoproteinämie und tiefgreifender Dysproteinämie zu. Die Leber wird ja auf Grund neuerer Erkenntnisse nicht mehr nur als Bildungsstätte des Serumalbumins, sondern auch verschiedener Globuline, so der α -Globuline, einzelner β -Globuline und des Fibrinogens, angesehen. Hier ergeben sich unter Umständen Beziehungen zur WILSONschen Erkrankung, bei welcher die Coeruloplasminfraktion im Serum bekanntlich vermißt wird. Es wäre denkbar, daß im Rahmen der bei dieser Krankheit regelmäßig beobachteten Leberzirrhose der Coeruloplasminschwund resultiert, so daß das Fehlen der Kupferfraktion nicht etwa als ein primärer «Defekt» sondern als Folge der insuffizienten Stoffwechselleistung der erkrankten Leber anzusehen ist.

Bei Kohlenhydratfärbung normaler Seren werden praktisch alle Komponenten, auch die Präcipitationslinien der Unterfraktionen dargestellt. Das beweist, daß die Serumeiweißkörper im Prinzip Glykoproteide sind, was im übrigen durch biochemische Untersuchungsergebnisse bereits als gesichert gilt (7). Bei den untersuchten pathologischen Seren lassen sich, wie in den Resultaten aufgezeigt, die deutlichsten Intensitätsschwankungen im Bereich der α_2 -Globuline erkennen, wobei vor allem bei akut entzündlichen Prozessen die auffälligsten Befunde erhoben werden konnten. Pathologische Serumeiweißkörper, das heißt Paraproteine vom Typ der Myelomproteine oder der Makroglobuline zeigten in den untersuchten Fällen ebenfalls eine stärkere Anfärbbarkeit. Dies deckt

sich mit Angaben in der einschlägigen Literatur (11) und ebenso mit papierelektrophoretischen sowie biochemischen Befunden, auf die jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. Somit stellen solche Paraproteine ebenso wie physiologische Eiweißkörper Glykoproteidkomplexe dar. Die stärkere Anfärbbarkeit besagt, daß in den aufgezeigten Beispielen eine quantitative Anreicherung von Kohlenhydraten bei den einzelnen Fraktionen vorliegt. Eine Deutung dieser Phänomene im Hinblick auf pathophysiologische Vorgänge erscheint uns bei dem vorliegenden unausgewählten Krankengut verfrüht.

Die bisher gewonnenen Ergebnisse mit kombinierter Kohlenhydrat- und Kupferfärbung lassen Gesetzmäßigkeiten vorerst nicht erkennen. Immerhin konnte gezeigt werden, daß zum Beispiel im Rahmen einer Tumorerkrankung mit α_2 -Vermehrung im Elektrophoresediagramm vorwiegend die Coeruloplasminfraktion, bei akut entzündlichen Erkrankungen dagegen vorwiegend kohlenhydrattragende Komponenten im α_2 -Bereich vermehrt zur Darstellung gelangen.

Die Resultate der Proteinfärbung sollen in vorliegender Arbeit nicht Diskussionsgegenstand sein. Auf die wichtigsten Gesichtspunkte der Auswertung und Differenzierung solcher Befunde wurde in einer früheren Übersichtsarbeit bereits hingewiesen (6).

Die aufgezeigten Ergebnisse lassen somit erkennen, daß in der Kombination von Gelelektrophorese und verschiedenen Färbemethoden eine Untersuchungsmöglichkeit gegeben ist, die auch für klinische Belange praktische Bedeutung hat. Die angegebenen Methoden, insbesondere die Färbetechniken, sind relativ einfach. Sie können in jedem Routinelaboratorium ohne besondere Voraussetzungen durchgeführt werden. Aufwandreichere Serumanalysen, etwa die Charakterisierung von Makroglobulinen mit der Ultrazentrifuge oder biochemische Aufklärung einzelner Proteineigenschaften, können somit für die hier erforderlichen differentialdiagnostischen Fragestellungen wegfallen.

Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde der differentialdiagnostische Wert der kombinierten Kupfer-, Kohlenhydrat- und Proteinfärbung nach Agarelektrophorese an den Seren eines unausgewählten Krankengutes geprüft. Die Ergebnisse ermöglichen eine weitere differentialdiagnostisch wertvolle Analyse, die sich vor allem auch für den klinischen Routinebetrieb eignet. So ist zum Beispiel die Coeruloplasminfraktion bei Tumoren

und bei chronisch entzündlichen Prozessen deutlich vermehrt. Dagegen zeigt sie bei Leberzirrhosen eine Verminderung. Auf Grund der Kohlenhydratfärbung ergibt sich bei akut entzündlichen Erkrankungen vielfach eine stärkere Anfärbbarkeit aller α -Globulinfractionen, bei Tumorerkrankungen und chronisch entzündlichen Prozessen jedoch allenfalls normale Farbintensität oder sogar schwächere Anfärbbarkeit der Glykoproteide. Bei der Proteinfärbung lassen sich im allgemeinen adäquate Verhältnisse aufzeigen.

Summary

In the present study, the differential diagnostic value of combined copper, carbohydrate and protein staining after agar electrophoresis was investigated in the sera of an unselected series of patients. The results have enabled a further valuable differential diagnostic analysis to be developed which will be particularly suitable also for routine hospital examinations. The coeruloplasmin fraction, for example, is markedly increased in tumours and chronic inflammatory processes, but decreased in cirrhosis of the liver. On the basis of carbohydrate staining, there is often an increased affinity for stain in all α -globulin fractions in acute inflammatory disease, compared with at most a normal intensity or even a weaker staining tendency of the glycoproteins in chronic inflammatory processes or neoplastic disease. In protein staining, appropriate conditions usually obtain.

Résumé

Les auteurs se proposent d'examiner dans le travail présent l'importance d'une coloration combinée du cuivre, des hydrates de carbone et des protéines après l'électrophorèse en gélose pour le diagnostic différentiel et appliquent cette coloration combinée aux sérums d'un collectif de malades sans sélection particulière. Les résultats permettent une analyse plus détaillée, importante pour le diagnostic différentiel, dont surtout les examens de routine d'une clinique peuvent tirer profit. La fraction de la céruloplasmine par exemple est nettement augmentée dans les cas de tumeur et de processus inflammatoires chroniques. Par contre les cirrhoses hépatiques sont accompagnées d'une diminution des mêmes fractions. Quant à la coloration des hydrates de carbone toutes les fractions des alpha-globulines prennent ces colorants très souvent mieux lors de la présence d'une inflammation aiguë, tandis que l'intensité de la coloration de glycoprotéides est normale ou moins forte en présence d'une tumeur ou d'une inflammation chronique. La coloration des protéines donne en général des résultats équivalents.

Literatur

1. GÖTZ, H.; BERG, G. UND SCHEIFFARTH, F.: Methodische Grundlagen der Immunelektrophorese. *Z. Immunforsch.* 114: 72 (1957).
2. GÖTZ, H. UND SCHEIFFARTH, F.: Über die Änderung der Serum-Unterfraktionen, insbesondere der β -Immunkfraktionen, im Verlaufe der Myelomkrankheit. *Acta haemat.* (im Druck).
3. GRABAR, P.: a) Etudes sur les protéines à l'aide de méthodes immuno-chimiques. *Bull. Soc. Chim. biol.* 36: 65 (1954). – b) Die Anwendung immunochemischer Methoden bei der Untersuchung der Proteine, insbesondere der Serumproteine. *Dtsch. med. Wschr.* 79: 1916 (1954). – c) Immunelektrophoretische Analyse. *Behringwerk-Mitt.* 30: 23 (1955).
4. GRABAR, P. ET WILLIAMS, C. A.: a) Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. *Biochim. biophys. Acta* 10: 193 (1953). – b) Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. biophys. Acta* 17: 67 (1955).

5. HORST, W.: Transport und Bindung im Serum. Untersucht mit Papierelektrophorese und radioaktiven Indicatoren (Fe 55/59, Cu 64, Co 56/57, Mn 52, Ga 67, S 35, J 131). *Klin. Wschr.* 32: 961 (1954).
6. SCHEIFFARTH, F. UND GÖTZ, H.: Die Bedeutung der Immunoelktrophorese bei der Differenzierung pathologischer Seren. *Int. Arch. Allergy* 16: 61 (1959).
7. SCHULTZE, H. E.: Über Glykoproteine. *Dtsch. med. Wschr.* 83: 1742 (1958).
8. URIEL, J.: a) Etude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose. *Bull. Soc. Chim. biol.* 39: Suppl. I, 105 (1957). – b) Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose. I. Considérations générales. Application a l'étude de constituants protéiques isolés. *Clin. Chim. Acta* 3: 234 (1958).
9. URIEL, J.; GÖTZ, H. ET GRABAR, P.: Etude de la céruloplasmine du sérum humain par l'électrophorèse en gélose et l'analyse immuno-électrophorétique. Microdétection colorimétrique du cuivre lié aux protéines. *Schweiz. med. Wschr.* 87: 431 (1957).
10. URIEL, J. ET GRABAR, P.: Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur* 90: 429 (1956).
11. URIEL, J.; GRABAR, P. ET WUNDERLY, CH.: Etude d'un sérum de macroglobulinémie par l'électrophorèse en gélose et sur papier et par ultracentrifugation. *Clin. chim. Acta* 2: 35 (1957).
12. URIEL, J. ET SCHEIDEGGER, J. J.: Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* 37: 165 (1955).
13. WILLIAMS, C. A. AND GRABAR, P.: a) Immunoelctrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of human serum. *J. Immunol.* 74: 158 (1955). – b) Immunoelctrophoretic studies on serum proteins. II. Immunsera: Antibody distribution. *J. Immunol.* 74: 397 (1955). – c) Immunoelctrophoretic studies on serum proteins. III. Human gamma-globulin. *J. Immunol.* 74: 404 (1955).
14. WOLFF, H. P.; LANG, N. UND KNEDEL, M.: Untersuchungen mit Cu⁶⁴ über die Bindung des Kupfers an Serumciweißkörper. *Z. exp. Med.* 125: 359 (1955).

Adresse der Autoren: Prof. Dr. F. Scheiffarth, Dr. H. Götz und Dr. H. Knopff, Medizinische Univ.-Klinik, Erlangen (Deutschland).

LEBENS LAUF

Am 25. November 1924 wurde ich, Hannelore Margarethe Knopff, als Tochter des Tierzuchtinspektors Dr. phil. Heinz Knopff und seiner Ehefrau Erika, geb. Dawert, in Königsberg/Pr. geboren.

1942 machte ich an der Luisenschule in Allenstein Abitur. Nach Ableistung des RAD begann ich 1943 in Königsberg/Pr. Medizin zu studieren, bis ich im Herbst 1944 über den RAD zur Flak einberufen wurde. Nach dem Zusammenbruch arbeitete ich in Lazaretten und im Annastift in Hannover als DRK-Schwesternhelferin. Von 1947 bis 1950 besuchte ich die Kirchenmusikschule in Hannover und legte dort die Prüfung für Kirchenmusik ab. Von 1951 bis 1953 machte ich in Münster in Westf. die Ausbildung als med. techn. Assistentin und war in diesem Beruf bis zum Herbst 1955 tätig. Dann studierte ich weiter Medizin in Münster, wo ich im Frühjahr 1957 die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach dem ersten klinischen Semester, ebenfalls in Münster, war ich zwei Semester in Innsbruck und die letzten drei Semester in Erlangen, wo ich im Sommer 1960 das medizinische Staatsexamen ablegte.

Erlangen, 17. November 1961

